

Uso de ratas y ratones en el estudio de la caries dental

Use of Rats and Mice for the Study of Dental Caries

Lorenza María Jaramillo Gómez

Ingeniera química, Universidad Nacional de Colombia. Magistra en Ciencias. Candidata al Doctorado en Ciencias. Profesora asistente, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Nelly Stella Roa Molina

Odontóloga. Magistra en Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Candidata al Doctorado en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México. Profesora asistente, investigadora del Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana.

Margarita Chaves Clavijo

Bacterióloga. Magistra en Ciencias. Profesora asistente, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Camilo Durán Correa

Odontólogo, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Magíster en Ciencias. Magíster en Prostodoncia. Profesor asociado, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

El presente artículo analiza la evidencia científica disponible acerca del uso de ratas y ratones en la investigación de caries dental. En el estudio de la caries dental ha contribuido decisivamente al entendimiento de su etiología y patogenia. Desde 1922, cuando se diseñaron los primeros experimentos *in vivo* para confirmar las observaciones en humanos, y hasta la fecha, la rata sigue siendo el modelo animal más usado para este propósito. El objetivo de los primeros experimentos se orientó a encontrar la asociación entre las fórmulas alimenticias y el grado de las lesiones cariosas. Sin embargo, los resultados experimentales no pudieron comprobar esta correlación, pero sí permitieron establecer la asociación entre microorganismos propios de la flora oral y la caries, y reconocer que, debido a su acidogenicidad, el principal microorganismo cariogénico es el *Streptococcus mutans*. El modelo de rata y ratón también ha sido fundamental en el estudio de las relaciones existentes entre algunas condiciones sistémicas y la caries. Recientemente, la disponibilidad de cepas de roedores modificados genéticamente impulsa el avance del desarrollo de vacunas de ADN anticaries, mientras que el principal enfoque tendiente a reducir su incidencia mundialmente se sigue concentrando en el desarrollo de terapias para prevenir su aparición.

PALABRAS CLAVE

Roedores, rata, ratón, caries, dieta, condiciones sistémicas, vacunas anticaries.

ÁREAS TEMÁTICAS

Modelo animal, caries dental, ciencias de los animales de laboratorio.

ABSTRACT

This article analyzes available scientific evidence about the use of rats and mice to study dental caries. In the study of dental caries, the use of mice and rats has greatly contributed to understand the etiology and pathogenesis of this condition. Since 1922, when the first *in vivo* experiments were designed to confirm human observations, the rat has been the most widely used animal model. The objective of the first experimental designs was aimed at establishing the relationship between diet formulations and the degree of carious lesions. However, results failed to demonstrate this correlation and, instead, they have proved a definite association between the presence of endogenous oral microorganisms and dental caries, recognizing *Streptococcus mutans* as the primary etiologic agent due, in part, to its acidogenic capacity. The mouse and rat models have also played a major role in understanding relationships between systemic conditions and caries. Recently the use of genetically modified strains has favored the development of DNA anti-caries vaccines, but the principal approach for decreasing its worldwide incidence is still focused on prevention.

KEY WORDS

Rodents, rat, mouse, caries, diet, systemic conditions, anti-caries vaccines.

THEMATIC FIELDS

Animal models, dental caries, laboratory animal sciences.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Jaramillo LM, Roa NS, Chaves M, Durán C. Uso de ratas y ratones en el estudio de la caries dental. Univ Odontol. 2013 Jul-Dic 32(69):35-48.

SICI:

2027-3444(201307)32:69<35:URRECD>2.0.CO;2-2

Recibido para publicación: 28/09/2012

Aceptado para publicación: 15/04/2013

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

INTRODUCCIÓN

El presente artículo analiza la evidencia científica disponible acerca del empleo de ratas y ratones en la investigación de caries dental. El uso del modelo animal en experimentación biomédica ha incluido roedores (ratones, ratas, hámsteres, jerbos, conejillos de indias y conejos), así como especies filogenéticamente más elevadas (gatos, perros y primates no humanos). Especialmente el uso de ratas y ratones, en el estudio de la caries dental, ha contribuido fundamentalmente a entender su etiología, patogenia, fisiopatología, factores modulantes micromedioambientales, y a su prevención.

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes en los seres humanos (1). Es el resultado de una infección crónica que causa lesiones en el tejido dental, disolviéndolo y formando oquedades que, a medida que aumentan en tamaño, pueden producir infecciones pulpares y eventualmente determinar la pérdida del diente afectado. Es causada por un consorcio bacteriano organizado en una biopelícula que sostiene un microecosistema ácido, resultado de la fermentación de los carbohidratos de la dieta (2). Siendo su distribución geográfica tan amplia y debido a que afecta a niños, adolescentes y adultos (3), ha ocupado el interés de la profesión dental en los últimos siglos, y el uso del modelo animal en su investigación ha permitido profundizar en su entendimiento, impulsar la exploración de nuevas terapias anticaries y establecer políticas de prevención efectivas (4).

En general, el uso del modelo animal en experimentación ha facilitado el desarrollo de vacunas, técnicas de bioingeniería y procedimientos de cirugía experimental y ha contribuido ampliamente a la evolución de las ciencias biológicas. De los animales experimentales, los pequeños roedores, como los ratones y las ratas, son los más utilizados para la investigación en ciencias básicas, fisiología y medicina (5).

En 1948, entre los profesionales que usaban el modelo animal en investigación, se comenzó a gestar un movimiento que hacía hincapié en la obligación de la comunidad científica de proveer a los animales de experimentación todas las consideraciones que aseguraran su bienestar, y por esta razón conformaron el Panel de Cuidado Animal, progenitor de la Asociación Americana de Ciencia de Animales de Laboratorio (AALAS, por su sigla en inglés). A partir de esa fecha, tanto en Europa como en América del Norte, se han dictado regulaciones de obligatorio cumplimiento

para los miembros de las comunidades científicas que trabajan bajo su jurisdicción y que garantizan los derechos de los animales, racionalizando su uso y proveyéndolos de ambientes enriquecidos que mejoran de modo significativo sus condiciones de cautiverio.

Russell y Burch, en 1959, emitieron el concepto de las 3R (del inglés, *replacement, reduction and refinement*), que obliga a cualquier persona responsable de un procedimiento científico o docente en el que se utilicen animales a contestar las siguientes preguntas (6,7):

1. ¿Pueden obtenerse los mismos resultados con una técnica alternativa al uso de animales o que, al menos, permita reducir su número o disminuir su sufrimiento? (Sustitución o remplazo).
2. ¿Puede mejorarse el diseño experimental o la uniformidad de los animales utilizados con el objeto de disminuir el tamaño de muestra, es decir, el número de animales? (Reducción).
3. ¿Puede mejorarse el protocolo experimental de forma que se reduzca el sufrimiento de los animales utilizados? (Refinamiento).

En la actualidad, la experimentación animal se debe regir por los principios establecidos en la octava edición de la *Guía de cuidado y uso de animales de experimentación* (8) y en la directiva 2010/63/EU de la Unión Europea para la protección de animales usados con propósitos científicos (9):

El propósito de la Guía de cuidado y uso de animales de experimentación (la Guía), es asistir a las instituciones en el cuidado y uso de animales de manera que sean científica, técnica y humanitariamente apropiadas. La guía también tiene la intención de ayudar a los investigadores a cumplir con su obligación de planear y conducir los experimentos con animales de acuerdo con los más altos principios científicos, humanitarios y éticos. Las recomendaciones de la Guía se fundamentan en información publicada, principios científicos, opiniones de expertos, y en la experiencia con métodos y prácticas que han probado ser consistentes con la investigación de alta calidad y con el uso y cuidado humanitario de animales. (8)

Acogerse a estas normas garantiza un trato digno hacia los animales, controles experimentales rigurosos

y mejora la calidad de la investigación, facilitando la evaluación por pares y la publicación de resultados científicamente sólidos.

Los animales de experimentación se consideran reactivos biológicos y, por consiguiente, su caracterización genética, certificación sanitaria y el estricto control de las condiciones de hospedaje son algunos de los elementos que permiten obtener resultados investigativos confiables y reproducibles (10). Variables como temperatura, humedad relativa, intensidad lumínica, duración del ciclo de luz, calidad del alimento y de la cama, manipulación, ubicación espacial dentro de la sala de hospedaje y muchas otras deben ser tenidas en cuenta, ya que afectan de manera importante los resultados experimentales y deben ser reportadas junto con ellos. Si bien es cierto que el control riguroso de las condiciones micro y macro medioambientales es imprescindible para asegurar la calidad de los resultados experimentales, es igualmente trascendental conseguir que el ambiente de hospedaje proporcione bienestar a los animales. Este valioso modelo está constituido por seres vivos con necesidades físicas y psicosociales.

La Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, consciente de la importancia que tiene la utilización de los modelos animales en investigación, construyó una Sala de Experimentación Animal (Seafouj) que cumple con las normas internacionales de uso de animales de experimentación y así abrió las puertas a una gran variedad de proyectos en investigación biomédica. En la actualidad, el grupo de caries dental de la Facultad de Odontología tiene interés en desarrollar y estandarizar un modelo de caries dental en ratas. Al mismo tiempo, la Facultad de Odontología ha liderado dentro de la comunidad universitaria la toma de conciencia en todos los aspectos del bienestar animal y ha constituido el Programa de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Picual Fouj), al conformar el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Cicual Fouj) e implementar el Programa de Educación Continuada en Ciencia de Animales de Laboratorio (Pecual Fouj). Trabajando en estos tres frentes y siendo consecuentes con el principio universalmente aceptado de las 3R, se ha pretendido propagar dentro de los investigadores de la institución una cultura de respeto hacia los animales que entregan su vida para lograr el avance del conocimiento.

En odontología, la rata es uno de los modelos animales más indicados para la investigación en caries, ya que tiene ventajas, como su facilidad de manipulación,

un promedio de vida corto y un tamaño dental que facilita las observaciones macroscópicas. Sin embargo, es frecuente que la inducción de la caries requiera manipulaciones experimentales, como la infección con bacterias patogénicas y la utilización de dietas altamente cariogénicas.

LAS PRIMERAS RATAS DE LABORATORIO

Las ratas de laboratorio son descendientes de la rata noruega *Rattus norvegicus* y es posible que las albinas, negras o encapuchadas hayan sido capturadas o seleccionadas preferentemente de camadas naturales por su apariencia especial (11). Las primeras ratas albinas fueron introducidas en los laboratorios de Europa alrededor de 1828 y se utilizaron para estudios fisiológicos; mientras que los primeros experimentos de cría en un laboratorio los realizó Crampe, entre 1870 y 1880. Posteriormente, las ratas blancas de origen europeo fueron llevadas a Norteamérica y se convirtieron en el pie de cría de las ratas de los laboratorios americanos. El reporte más antiguo de cría endogámica, es decir, de cruces entre hermanos para obtener las llamadas cepas endocriadas se hizo en 1856, cuando el Jardín de Plantas, de París, reportó este tipo de cruzamiento en una colonia de ratas encapuchadas (11). Las cepas más utilizadas en investigación de caries dental en ratas son la *Wistar*, *Sprague-Dawley* y *Osborn Mendel*, desarrolladas en 1906, 1925 y 1909, respectivamente.

IMPORTANCIA HISTÓRICA DEL MODELO ANIMAL EN EL ESTUDIO DE LA CARIES DENTAL

El uso del modelo animal en el estudio de la caries dental se remonta a las publicaciones de McCollum, en 1922 (12), en las que se evaluó el papel de la dieta como factor etiológico. En ese momento no se daba importancia a los microorganismos en su etiología, a pesar de que los resultados de las investigaciones de Kligler y Gies ya la habían sugerido (13). En sus estudios trata de establecer los grados de fermentación de ciertos carbohidratos, como la glucosa, la lactosa y la sacarosa, como consecuencia de la acción de las bacterias orales sobre esos sustratos, el efecto del mucinato (que él consideraba un componente importante de la saliva) en el crecimiento bacteriano, la acción de las bacterias en este componente y la acción solvente de ciertos microorganismos cuando actúan de manera independiente y conjunta en dientes pulverizados. Las conclusiones del estudio

afirman que en las lesiones cariosas hay mayor presencia de *Bacillus acidophilus* (*B. acidophilus*), de *Cladothrix placoides* (*C. placoides*) y de *Leptotrichia buccalis* (*L. buccalis*), a pesar de que los mayores productores de ácido además del *B. acidophilus* fueron el estafilococo y el estreptococo.

En 1932, Hoppert y colaboradores (14) afirmaron que la caries es una enfermedad causada por deficiencias de uno o varios componentes de la dieta. Para probar esta hipótesis alimentaron a dos grupos de ratas con dietas diferentes —una con base en harina de maíz y la otra en harina de avena— y encontraron que la fórmula con base en maíz producía caries; mientras que la basada en avena no. Los resultados del estudio indicaron que el factor determinante en la etiología de la caries dental era el tipo de dieta, y más precisamente el tamaño de la partícula, ya que las más pequeñas que se alojaban en los surcos dentales producían la caries. Concluyeron que es necesario que se cumplan dos condiciones para que se produzca la caries: el empaquetamiento del alimento en los surcos dentales y la presencia en ellos de bacterias acidofílicas y probablemente proteolíticas.

Otro estudio de la época (1933), en el cual nuevamente no se tiene en cuenta el papel bacteriano en el desarrollo de las lesiones cariosas, fue realizado en ratas de la cepa encapuchada Long-Evans (15). En este se quiso determinar la susceptibilidad de las ratas a la caries dental típica de fisuras, con la administración de una dieta con prevalencia de arroz moreno y dextrina de papa blanca o maltosa y con deficiencia de proteínas, minerales y vitamina D, y se comparó con la misma dieta, pero con las deficiencias completamente corregidas. En ambas dietas se dio mayor importancia al tamaño de la partícula del alimento y a la posibilidad de su acumulación en las fosas de los molares afectados. Los resultados obtenidos mostraron que las lesiones se produjeron de igual manera en los dos grupos e indicaron que la insuficiencia en la dieta no es un factor determinante en la etiología de la caries en estos animales (15).

A pesar de que la interacción entre las bacterias y el sustrato era evidente, la tendencia de investigación seguía dando mayor importancia a los aspectos físicos de la dieta, y solo hacia 1940 las investigaciones lograron establecer de manera confiable una asociación entre la presencia de algunos microorganismos en la cavidad oral y la caries. Distintos estudios demostraron que en las lesiones cariosas tanto de animales como de humanos se encontraban ciertas es-

pecies de bacterias, y dentro de estas especies, tipos bacterianos identificables bioquímicamente (16-18).

Más tarde, en 1950, Kite y colaboradores (19) comprobaron experimentalmente la importancia de la asociación entre la presencia de sustrato y los agentes bacterianos. En este trabajo, se alimentaron ratas albinas muy susceptibles a la caries con una dieta altamente cariogénica, mediante un tubo endogástrico, que prevenía así el contacto del alimento con la cavidad oral durante periodos de hasta veinticinco semanas. Ningún individuo alimentado de esta manera desarrolló caries; mientras que los que se alimentaron por vía oral sí lo hicieron.

La relevancia del papel de los microorganismos en el proceso carioso fue definitivamente reafirmado por Orland y sus colaboradores, en 1954, en su artículo “Uso de la técnica de animales abióticos en el estudio experimental de la caries dental” (20). La importancia que tuvo el modelo animal en sus descubrimientos se refleja en que

La flora bacteriana de la boca y más específicamente de la variedad de lesiones es tan compleja que cualquier potencial cariogénico de los microorganismos está siendo constantemente sometido a influencias modificadoras que se originan en la acción simultánea de algunas o todas las numerosas especies y variedades comúnmente presentes en esta área localizada. Estos efectos modificantes pueden ser aditivos (simbióticos), neutralizantes o inhibitorios (antibióticos). Aun cuando la causa de la caries dental se pueda encontrar en fenómenos aparte de aquellos relacionados con las actividades metabólicas de la flora bacteriana local, como ha sido postulado por unos pocos investigadores, la demostración objetiva de tal fenómeno es extremadamente difícil, si no imposible por la naturaleza ubicua de los microorganismos orales algunos de los cuales tienen la capacidad *in vitro* de llevar a cabo la disolución de la sustancia dental que asemeja, en algunos aspectos, ciertos estadios de la caries dental. Con base en las anteriores consideraciones, hemos emprendido una serie de investigaciones con animales que inicialmente estaban libres de bacterias, pero a los cuales se les pueden introducir una o múltiples cepas de bacterias conocidas.

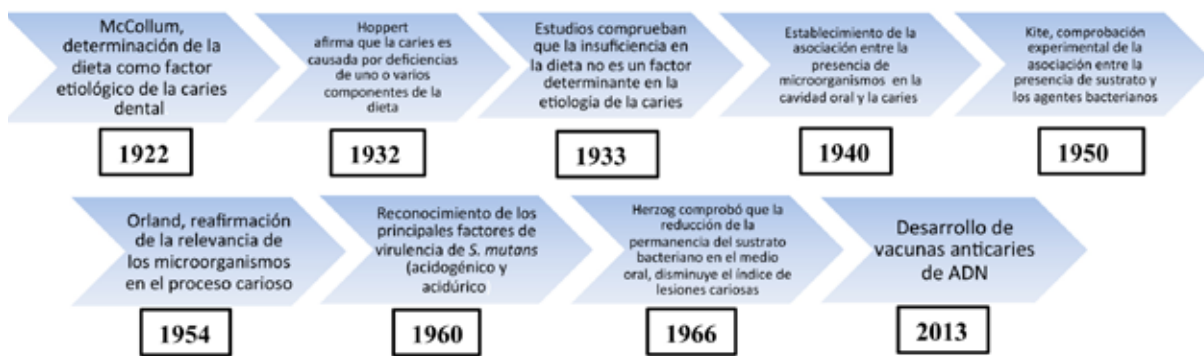
Solo mediante este proceso es posible demostrar claramente el efecto bacteriano en los dientes de animales, a los cuales le han suministrado una dieta que en animales normales induce abundante caries dental. (20)

Para este trabajo, desarrollaron procedimientos que les permitían obtener y mantener los individuos libres de gérmenes (animales axénicos) durante largos periodos, utilizando cámaras aisladoras, por medio de las cuales se sometían a muestreos constantes para certificar dicha condición. El control experimental total de los microorganismos ubicados dentro y alrededor del animal mediante la técnica libre de gérmenes hizo posible excluir todas las bacterias y permitir que la misma dieta proporcionada a las ratas en condiciones normales produjera caries en abundancia; en las libres de gérmenes no producía siquiera la aparición de lesiones cariosas microscópicas.

La conclusión más importante de este trabajo fue que la caries dental no se genera en ausencia de microorganismos, aun cuando la dieta sea cariogénica (20). Esta publicación marca un hito en la explicación de la etiología de la caries dental y el uso del modelo animal con un alto grado de refinamiento, responsable en gran parte de los resultados obtenidos. Los autores también mencionan que el papel de la herencia en el desarrollo de la caries debe evaluarse, y si bien la influencia de este factor en humanos es difícil de determinar, los modelos animales han aportado evidencia a este respecto y su influencia puede estar relacionada con la forma del diente, la distribución de la dentición, la composición química de la saliva, el esmalte y la dentina, o a través de otros factores no determinados hasta ese momento.

A partir de esta fecha, la investigación en cariología y la utilización del modelo animal ha permitido avances considerables en múltiples áreas, que van desde la evaluación de la importancia de los sustratos bacterianos hasta los últimos avances en inmunización y terapias antimicrobianas. Los principales hallazgos durante la historia del uso de ratas y ratones en estudios que conducen al entendimiento de la caries dental se resumen en el esquema presentado en la figura 1.

FIGURA 1
IMPORTANCIA HISTÓRICA DEL MODELO ANIMAL EN EL ESTUDIO DE LA CARIES DENTAL: PRINCIPALES HALLAZGOS DURANTE LA HISTORIA DEL USO DE RATAS Y RATONES EN ESTUDIOS QUE CONDUCEN AL ENTENDIMIENTO DE LA CARIES DENTAL



EL EFECTO DEL SUSTRATO EN LA CARIES DENTAL

La existencia de individuos susceptibles y resistentes a la caries en una misma camada de ratas y la necesidad de evaluar el efecto del aumento de carbohidratos de la dieta en la actividad cariogénica llevaron al diseño de un experimento en que los individuos de una misma camada eran unidos quirúrgicamente para formar parejas parabióticas (21). La parabiosis es una técnica útil que permite eliminar muchas de las variables fisiológicas individuales en el estudio de la etiología de la caries dental. Con esta condición se buscó reducir las diferencias fisiológicas y posibilitar la evaluación del efecto neto del aumento en un 50% de dextrosa refinada en la dieta. Las conclusiones de este estudio demostraron que cuando una cepa de ratas resistente a la caries es alimentada con una dieta balanceada, desarrolla este tipo de lesiones con la adición de 50% por volumen de dextrosa. Las parejas parabióticas expuestas a la dieta alta en carbohidratos desarrollan una actividad cariosa con un patrón similar en la zona de molares.

Para determinar el efecto de la dieta en la composición del esmalte y la dentina, y su correlación con la resistencia a la caries, Wynn y colaboradores (22) alimentaron cuatro grupos de ratas de la misma camada con diferentes relaciones de calcio con fósforo (Ca/P) en la dieta. Tal relación se alteró manteniendo constante la concentración de calcio y variando la de fósforo. En uno de los grupos, en el cual las ratas fueron desalivadas, se redujo la incidencia de caries con una reducción de la relación de Ca/P de 1:0,5 a 1:2. Una reducción mayor en la relación 1:3 no produjo ningún efecto en la reducción del índice de caries.

En un segundo grupo, en el cual los individuos no se desalivaron para evitar la complicación de la incidencia de caries en el periodo de estudio, con ninguna de las dietas se modificó el contenido de nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio, flúor y dióxido de carbono (CO₂) en el diente; por consiguiente, la alteración de la relación Ca/P no se asoció con la composición de los dientes. Algunos años más tarde, Herzog y colaboradores (1966) usaron ratas de la cepa Osborne-Mendel para evaluar la influencia de los diferentes carbohidratos, de la bebida y del cepillado. Ellos encontraron que la reducción de la permanencia del sustrato bacteriano en el medio oral disminuye el índice de lesiones cariosas (23).

AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA CARIES DENTAL

A pesar de la complejidad de la flora oral humana, los estudios en el modelo animal y los levantamientos epidemiológicos allanaron el camino para un mejor entendimiento del papel protagónico del *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) en la etiología de la caries y sus interacciones con otros microorganismos de la cavidad oral. Su fisiología, los mecanismos de virulencia y de interacción con el sustrato se han documentado extensamente (24). En principio, las propiedades de virulencia potenciales del *S. mutans* se identificaron por comparación con otros estreptococos orales, y uno de los primeros factores de virulencia putativos identificados por esta aproximación fue su habilidad para colonizar superficies lisas in vitro, cuando está en presencia de sacarosa (25).

El *S. mutans* que coloniza la superficie dental supra-gingival forma parte de una microflora oral compleja, conformada por unas 700 especies. Para mantener su presencia dominante y producir caries, este organismo acidogénico y acidúrico es capaz de reducir drásticamente el pH de su medio ambiente y producir la desmineralización del esmalte. También secreta péptidos antimicrobianos (mutacinas) para suprimir el crecimiento de otras especies con las cuales compite (26). De los cuatro serotipos de *S. mutans*, el c es el predominante en la boca (27). Su interacción con el medio ambiente y un mejor entendimiento del papel de los mecanismos de transporte de metabolitos son importantes para concebir métodos que permitan reducir su efecto cariogénico (28,29).

La interacción de los microorganismos que conforman la microflora oral y sus productos metabólicos, los componentes de la saliva y los carbohidratos de la dieta son los responsables del establecimiento de una biopelícula sobre los dientes que en la clínica se conoce como placa dentobacteriana. Existen dos factores principales que controlan la patogenicidad de esta placa: el primero es la formación de una matriz de polisacárido extracelular (PSE), por parte del *S. mutans*, y el segundo es la acidificación de la placa dental. Las estrategias utilizadas por el *S. mutans* para resistir las condiciones desfavorables de la acidificación de la biopelícula reflejan la diversidad y el dinamismo de los nichos presentes en la cavidad oral. Todos los estreptococos de la cavidad oral son capaces de degradar rápidamente el azúcar a productos terminales ácidos, y como resultado el pH del microambiente circundante baja a concentraciones en que la glucólisis y el crecimiento se detienen. El *S. mutans* recurre a

mecanismos conducidos por una ATP sintetasa de la forma F, para protegerse de la acidificación bombeando protones hacia el exterior de la célula (30).

Para que se dé la colonización bacteriana sobre la superficie del diente, es indispensable que la placa dentobacteriana esté formada por un sustrato rico en polisacáridos, bien sea azúcar o almidón. Para evaluar cuál de estos dos sustratos, como componentes de la placa dentobacteriana, es más cariogénico se diseñaron dos estudios: uno en un modelo animal y el otro con un sistema *in vitro* de biopelícula oral (de acuerdo con el modelo de biopelículas de Zurich) (31). En el modelo *in vitro* se cultivaron biopelículas en discos de esmalte, con saliva y medio enriquecido con glucosa/sacarosa y almidón, en condiciones de anaerobiosis, y se midió la desmineralización de los discos por medio de la técnica de fluorescencia inducida. En el experimento *in vivo*, se evaluó el efecto de esos carbohidratos en la producción de caries de fisuras, de superficies lisas y en la formación de placa bacteriana. Los resultados en los dos modelos mostraron que el sustrato de almidón soluble es menos cariogénico que el de glucosa/sacarosa (32).

En modelos animales también se puede realizar un análisis microbiológico de las placas dentobacterianas formadas *in vivo*. Algunos investigadores han desarrollado estrategias para analizar las poblaciones bacterianas viables y la expresión génica a partir del aislamiento del ADN y el ARN de muestras de estas placas, que permiten cuantificar bacterias totales de poblaciones de *S. mutans* y de genes críticos para la virulencia del *S. mutans* *gtfB* y *gtfC* (glucosiltransferasas B y C). El desarrollo de estas técnicas ha engrandecido el valor del modelo de rata para entender la fisiopatología de la caries dental y abrir el camino para novedosas terapias anticaries (4).

La rata también ha permitido evaluar interrelaciones *in vivo* entre dos especies que colonizan los dientes y su asociación con la caries: el *S. mutans* y el *S. gordonii*. En el primero, la *GtfB*, y en el segundo, esta misma molécula, en conjunto con las proteínas de unión a las amilasas (*AbpA/AbpB*), determinan su capacidad de colonización. En el laboratorio se creó una cepa mutante de *S. gordonii*, con las secuencias de los genes de *GtfB* y *AbpA* interrumpidas y en un modelo de rata denominado TAN:SPFOM(OMASF) BR se hicieron inoculaciones con *S. mutans*, con *S. gordonii* y la cepa mutante de *S. gordonii*. El estudio mostró que el *S. mutans* supera al *S. gordonii* en capacidad de colonización, independientemente de la

dieta alta o baja en sacarosa suministrada a las ratas, la secuencia de inoculación, la cepa del *S. mutans* y la presencia o ausencia de mutaciones de los genes mencionados que están implicados en su capacidad de colonización (33).

Varios estudios demuestran un alto grado de diversidad y de rearrreglo genómico en *S. mutans*. Los análisis genómicos permiten un entendimiento más profundo de la forma cómo este microorganismo se ha adaptado para sobrevivir en el ambiente oral, mediante la adquisición de recursos, defensa contra los factores del huésped y uso de productos génicos para mantener su nicho contra sus competidores microbianos (34-36). Recientemente se ha reportado la secuencia genómica completa de un representante del serotipo c de la cepa GS-5, que profundiza en el conocimiento de las variaciones genéticas del *S. mutans* (37).

MORFOLOGÍA DE LA CARIES DENTAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATA

La susceptibilidad de algunas cepas a la caries dental se ha utilizado para realizar estudios en los cuales se evalúa la influencia de las condiciones del huésped o de la dieta en el proceso carioso. A partir de cierta edad, los machos de la cepa de ratas WBN/KobSlc desarrollan pancreatitis y luego presentan síntomas de diabetes, y al tratar de estudiar su condición pancreática los investigadores encontraron que los animales prediabéticos desarrollaban caries cuando eran alimentados con una dieta balanceada reportada como no cariogénica. Se evaluó la forma que adoptaron las lesiones en las ratas (hembras y machos) de la cepa WBN/KobSlc, con edades que fluctuaban entre los 3,7 y 7,8 meses de edad.

Los dientes que se afectaron primero bajo este esquema fueron los posteriores y las lesiones se localizaron principalmente en las fisuras de caras oclusales de los molares inferiores. Inicialmente se vio como un defecto parcial coronal que luego se expandió horizontalmente en la totalidad de la corona, de manera que el molar que la contenía desapareció. Este hallazgo fue interesante, ya que provee un modelo de rata para el estudio de la caries dental en el cual no hay que inducir el proceso mediante infección bacteriana o adición de polisacáridos a la dieta (38). En algunos individuos gerontes de la colonia Lewis de la Seafouj se han encontrado desmineralizaciones superficiales en las fosas de los molares superiores e inferiores que se pueden asociar con una lesión

cariosa incipiente (figura 2), lo cual podría estar indicando que esta cepa proporciona un buen modelo para los estudios en caries dental que próximamente serán desarrollados por investigadores de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

FIGURA 2
MAXILAR Y MANDÍBULA DE RATA GERONTE (7,8 MESES DE EDAD)



a y b) Las fosas profundas de los molares son el lugar de inicio de las lesiones cariosas; c) desmineralizaciones superficiales en las fosas de los molares inferiores; d) acercamiento de la fosa central del molar superior en la cual se observa una lesión cariosa incipiente.

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES SISTÉMICAS EN LA CARIES DENTAL

La influencia de las condiciones sistémicas en las patologías orales y periorales está ampliamente documentada. La asociación entre la diabetes y la gingivitis y periodontitis es reconocida y se considera que el tipo 2 presenta un mayor riesgo de destrucción periodontal que el tipo 1, pues existe una correlación entre la duración de la diabetes y la gravedad de la enfermedad periodontal. En un estudio se compararon pacientes diabéticos tipo 2 con sujetos no diabéticos, y se encontró que los primeros tenían una prevalencia mayor de caries radicular (40% versus 18,5%; $p = 0,001$), un mayor número de superficies obturadas o cariadas ($1,2 \pm 0,2$ versus $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,01$) y un porcentaje más elevado de periodontitis generalizada (98,1% versus 87,4%; $p < 0,01$); pero la prevalencia de superficies cariadas/obturadas no era significativamente diferente (83,8% versus 72,8% y $8,0 \pm 9,4$ versus $6,3 \pm 7,5$, respectivamente) (39).

Existen cepas de ratas como la WBN/Kob, en las que algunos individuos desarrollan de forma espontánea esta condición y muestran hiperglucemia, glucosuria e intolerancia a la glucosa aproximadamente a los nueve meses de edad; mientras todos los individuos la desarrollan a los diecisiete meses y evidencian una marcada reducción de la respuesta insulogénica

(40). Observaciones clínicas sugieren que los dientes de los pacientes diabéticos están predispuestos a la caries, pero algunos investigadores no han encontrado una diferencia significativa en la susceptibilidad a caries entre pacientes diabéticos y no diabéticos (41).

Con el objeto de determinar si la diabetes induce o incrementa la enfermedad periodontal o la caries dental, se hicieron análisis morfológicos y morfométricos de tejido dental para los dos tipos de lesiones en machos diabéticos y hembras no diabéticas de ratas WBN/KobSlc y machos y hembras de ratas F344 no diabéticas de edades similares. Los resultados de la evaluación con rayos X mostraron que la incidencia y la gravedad de la caries dental y la enfermedad periodontal en los machos WBN/KobSlc es mayor que en las hembras no diabéticas de la misma cepa. En este estudio, el grado de caries en molares mandibulares estaba significativamente elevado en los machos diabéticos WBN/KobSlc alimentados con la misma dieta no cariogénica que las hembras no diabéticas de esta cepa. Además, la caries molar en el maxilar estaba más avanzada en los machos diabéticos, comparados con las hembras no diabéticas caries resistentes. Por consiguiente, las condiciones hiperglucémicas y no las asociadas al sexo parecen incrementar la formación de caries en las ratas WBN/KobSlc caries susceptibles (42).

Una de las grandes bondades del modelo animal es que se puede modificar para que desarrolle una determinada condición y, de esa manera, facilitar su estudio. Un ejemplo es la creación de un modelo de rata diabética inducida por acción de fármacos. En el 2011, Gutowska y colaboradores (43) diseñaron un experimento para evaluar si la modificación en el contenido mineral de los dientes podría facilitar la aparición de la caries. El experimento utilizó ratas Wistar a las que se les inyectó una solución tampón de citrato de estreptoziocina 0,01 M. La estreptoziocina es un compuesto natural descrito en la literatura como inductor de diabetes tipo 1 en ratas (44,45). El grupo control se inyectó solamente con la solución tampón citrato. La concentración sérica de glucosa y estradiol en las ratas diabéticas inducidas de modo farmacológico era significativamente mayor que en las del grupo control. En el grupo experimental se observó una reducción del contenido de flúor con elevación de calcio y magnesio en suero, acompañada de una reducción de flúor con elevación del magnesio en el tejido dental. Estas alteraciones en la composición del tejido dental podrían inducir la iniciación y progresión de la caries en los animales afectados por esta condición.

Los resultados de los estudios en animales aportan elementos clave para la experimentación en humanos. Así es como recientemente se evaluó la experiencia de caries en niños kuwaitíes que presentaban diabetes tipo 1, para llegar a la conclusión que era mayor en los niños afectados que en los no afectados (46).

La cepa de ratones NOD (*nonobese diabetogenic*) es el mejor modelo animal para el estudio de la diabetes mellitus tipo 1, insulino dependiente y el síndrome de Sjögren, que se desarrollan de manera espontánea y se caracterizan por infiltración linfática del páncreas y las glándulas salivales (47). Los cambios orales son prominentes en estas condiciones, que se manifiestan por resequedad en la boca e hiposalivación. Los ratones NOD también se utilizan como modelo para el estudio de enfermedades infecciosas orales asociadas con condiciones sistémicas como la diabetes o el síndrome de Sjögren, incluida la caries dental (48).

Otro ejemplo de cómo la relación entre una condición sistémica y la caries dental se puede evaluar usando el modelo animal tiene que ver con el caso de la fibrosis quística (FQ). De las condiciones de origen genético, esta es la más común entre los caucásicos, pues se presenta en aproximadamente uno de cada 3200 partos vivos (49). La FQ es causada por mutaciones del gen CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) y está asociada generalmente con alteraciones de la composición de la saliva (50). Esta alteración que se produce por efecto de la FQ y su correlación con el incremento en la incidencia de caries dental ha sido cuestionada (51).

Para lograr un mejor entendimiento del papel de la fibrosis quística en la incidencia de la caries dental se indujeron lesiones cariosas en ratones DF508 FQ, y en sus compañeros de camada con fenotipo silvestre. Los ratones FQ presentan una delección de fenilalanina 508 (mutación DF508) y reproducen muchas de las características observadas en humanos. Tan solo cinco semanas después de implementar una dieta cariogénica, se presentó un incremento drástico en el número y la intensidad de las lesiones cariosas que se desarrollaron en las superficies lisas y en los surcos de los molares en los ratones FQ. La incidencia elevada de caries se correlacionó con un incremento radical de la población viable de *S. mutans* en la placa de los animales FQ y con una reducción del pH salival y las concentraciones de HCO_3^- asociadas con su capacidad tampón (52).

TERAPIAS ANTIMICROBIANAS APLICADAS A LA CARIES DENTAL

Se ha experimentado con una gran variedad de terapias tanto en animales como en humanos, encaminadas a reducir la incidencia de la caries dental. En un principio, y muy ligado al esclarecimiento de la etiología, se utilizaron terapias antibióticas para neutralizar el efecto del *S. mutans* en el proceso carioso (53). La tendencia ha evolucionado con el tiempo, al pasar de la eliminación total del agente causante, a su remplazo con cepas no cariogénicas que compiten por el mismo nicho en la cavidad oral. Esta técnica fue propuesta en los años setenta y ochenta y demostró que el uso de mutantes de *S. mutans* deficientes en lactato deshidrogenasa (LDH) era altamente efectivo para prevenir la aparición de caries en ratas; pero no mostró los mismos resultados en primates (54). Años más tarde, un mutante (LDH) fue probado en un modelo de rata gnotobiótica y se encontró que era significativamente menos cariogénico en dos subcepas de ratas Sprague-Dawley. Las características deseables de este mutante incluyen una actividad similar a la de las bacteriocinas contra otros *S. mutans* cariogénicos, mas no contra otras cepas inocuas del mismo microorganismo (55).

Otra aproximación terapéutica tiene que ver con la habilidad que posee el *S. mutans* de adherirse a la película adquirida, ya que sintetiza glucanos extracelulares a partir de la sacarosa, utilizando glucosiltransferasas (GTF). Estas GTF —en particular la GTFB y la GTFC— se unen con avidez a la película que se forma en la superficie del diente y a la superficie de otros microorganismos, modulando la formación de biopelículas fuertemente adheridas. Hace poco se aisló a partir de una fruta comestible de la región amazónica del Brasil una benzofenona tetraprenilada (7-epiclusianona o 7-epi), que reduce de manera importante la síntesis de glucanos y la actividad glucolítica del *S. mutans*.

La 7-epi se aplicó de manera tópica en grupos de ratas Wistar recién destetadas e infectadas con *S. mutans* UA159, y a las cinco semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados para evaluar la presencia de caries. Se encontró que la aplicación de esta afectó la formación y cariogenicidad de las biopelículas del *S. mutans* y se convirtió en un potencial agente cariostático que se redujo significativamente con la terapia (56). Estos resultados fueron corroborados posteriormente en otro estudio que indicó que la 7-epi puede constituirse en un agente farmacológico novedoso en el tratamiento de la caries dental (57).

Los resultados a corto plazo de la utilización de terapia antimicrobiana fotodinámica (TAF) en el tratamiento de caries incipiente se evaluaron en un modelo de rata en el cual 29 machos se sometieron a inducción de caries mediante inoculación con una cepa ATCC 25175 de *S. mutans*. El grupo experimental se trató con una solución 100 μ M de azul de metileno por 5 min y luego se irradió por 3 min con una lámpara LED $\lambda = 645 \pm 30$ nm, con una tasa de fluencia de 480 mWcm⁻². Inmediatamente después de la irradiación se observó una disminución significativa en la población bacteriana, lo cual sugiere que la TAF puede reducir la actividad cariogénica bacteriana y prevenir una mayor pérdida de tejido mineralizado (58).

Vacunas genéticas anticaries

El modelo animal con roedores también ha sido útil para desarrollo de la vacuna anticaries. Las vacunas genéticas o vacunas de ADN deben ser seguras, por cuanto no deben producir mutagénesis (causar mutaciones sobre el ADN del huésped) por inactivación de los supresores de tumores o por la activación de un oncogen. Yang y colaboradores (59) evaluaron el potencial de una vacuna anticaries de ADN, la pcDNA3-gtfB, para lo cual se usaron 36 ratas Wistar, divididas en dos grupos: un grupo inoculado con la vacuna y el segundo sin inocular, durante 12 semanas. La seguridad de la vacuna fue evaluada por la comparación de las secuencias génicas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de seis órganos de los individuos del estudio (inoculados y no inoculados), el hígado, el riñón, el corazón, el pulmón, la glándula submandibular y el cerebro. Así se comprobó que el ADN inoculado no se integró al genoma de los órganos evaluados; estos resultados indican que efectivamente es segura y elevan su potencial aplicación como vacuna anticaries en humanos (59).

También se ha usado el modelo de rata para probar una vacuna de ADN anticaries denominada pGLUA-P, formada por el gen que expresa la región GLU de la GTF I y las regiones A y P de la proteína PAc del *S. mutans*. Se usaron grupos de ratas macho de la cepa Sprague Dawley (SD), recién destetadas y alimentadas con una dieta cariogénica. Se infectaron con *S. mutans* y dos días después se inmunizaron con una inyección de 100 μ l de esta vacuna, un grupo fue inoculado en el músculo femoral, otro en la glándula submandibular, otro por vía subcutánea y el último grupo control con el vector sin la vacuna. Las ratas infectadas y vacunadas fueron sacrificadas a los 63 días y se les extrajeron las mandíbulas para hacer

las mediciones de los índices de caries alcanzados por cada individuo. Los resultados demostraron que los grupos inmunizados tuvieron una experiencia de caries significativamente menor que el grupo control, y que al que se le administró la vacuna cerca a la glándula submandibular presentó mejor protección que los individuos de los otros grupos (60).

Se ha probado también la protección anticaries de la vacuna de ADN, denominada pGJA-P/VAX, en la cual fusionaron el fragmento de que codifica para GLU de la GTFB del *S. mutans* y el gen para el fragmento A-P del gen de PAc del *S. mutans*. Con esta vacuna de fusión inocularon ratas gnotobióticas y los resultados demostraron que redujeron los índices de caries causadas por *S. mutans*; pero la protección contra *S. sobrinus* fue muy débil (61). Para mejorar la efectividad de esta vacuna, este mismo grupo amplificó la vacuna de fusión con la adición del fragmento catalítico de la GTFI de *S. sobrinus* y lo clonaron dentro del plásmido pGJA-P/VAX para construir el nuevo plásmido recombinante pGJGAC/VAX.

Con esta nueva vacuna evaluaron la respuesta inmune humoral en mucosas y la respuesta sistémica en ratones inmunizados, así como la protección anticaries contra *S. mutans* y *S. sobrinus* en un modelo de rata; de ese modo encontraron que esta ofrece mayor protección contra el *S. sobrinus* (62). En la búsqueda de una vacuna anticaries que actúe sobre el *S. sobrinus*, se ha clonado y expresado el gen de la proteína enolasa de este microorganismo para obtener una proteína recombinante de esta y evaluar los posibles efectos terapéuticos en la protección contra la caries dental. Para esta evaluación se usaron ratas Wistar, que fueron alimentadas con una dieta sólida y cariogénica a partir del día 18 de nacimiento e infectadas oralmente con *S. sobrinus* durante cinco días, al cabo de los cuales se encontraron que en las ratas infectadas estaban aumentados las concentraciones salivales de IgA y de IgG y que los puntajes de caries fueron mucho más bajos, comparados con las ratas no infectadas. Los resultados indicaron que el uso tópico de enolasa recombinante de *S. sobrinus* podría usarse de forma segura y promisoria en vacunas contra la caries dental en humanos (3).

Si bien el modelo de rata y ratón ha sido fundamental en el avance del conocimiento de la caries, se deben explorar alternativas que reduzcan su utilización, como la propuesta por Featherstone y colaboradores (63), cuyo modelo de ciclaje de pH simula el efecto del

proceso carioso y muestra una precisión similar a la del modelo de rata.

CONCLUSIONES

En la presente revisión se ha analizado la evidencia científica que permite concluir que el modelo animal, en especial la rata, ha sido fundamental históricamente en el estudio de la caries dental. Estudios en esta especie han permitido establecer la relación de la caries con la presencia de microorganismos en la cavidad oral y con la dieta, la influencia de las condiciones sistémicas de un individuo en el avance de esta condición, el desarrollo de terapias antimicrobianas y, en el futuro inmediato, su contribución especialmente en lo que tiene que ver con el diseño de terapias para su prevención.

REFERENCIAS

1. Inaba E, Uematsu H, Nishiyama Y, Watanabe H, Senpuku H. The role of anti-PAc (361-386) peptide SIgA antibody in professional oral hygiene of the elderly. *Gerodontol.* 2009 Dec; 26(4): 259-67.
2. Jaramillo L. Metabolismo de los microorganismos asociados a la caries. *Univ Odontol.* 2000 May; 20(Suppl 1): 49-55.
3. Dinis M, Tavares D, Veiga-Malta I, Fonseca AJ, Andrade EB, Trigo C, Ribeiro A, Videira A, Cabrita AM, Ferreira P. Oral therapeutic vaccination with *Streptococcus sobrinus* recombinant enolase confers protection against dental caries in rats. *J Infect Dis.* 2009 Jan; 199(1): 116-23.
4. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Mol Oral Microbiol.* 2012 Oct; 27(5): 350-61.
5. Seita Y, Sugio S, Ito J, Kashiwazaki N. Generation of live rats produced by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod.* 2009 Mar; 80(3): 503-10.
6. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
7. Stephens ML. Personal reflections on Russell and Burch, FRAME, and the HSUS. *Altern Lab Anim.* 2009 Dec; 37(Suppl 2): 29-33.
8. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academic Press; 2011.

9. Pyczak T. [Notification for intended animal research - remarks on the future procedures on the basis of the European Union Laboratory Animal Guideline 2010/63/EU]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2011 Sep-Oct; 124(9-10): 376-81.
10. Krinke G. *The laboratory rat.* London, UK: Academic Press; 2000.
11. Castle WE. The domestication of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1947 May; 33(5): 109-17.
12. Bowen WH. Rodent model in caries research. *Odontology.* 2013 Jan; 101(1): 9-14.
13. Klinger IJ, Gies WJ. Chemical studies of the relations of oral microorganisms to dental caries III: A biochemical study and differentiation of oral bacteria, with special reference to dental caries. *J. Allied Dent Soc.* 1915; 10: 445-58.
14. Hoppert CA, Webber PA, Canniff TL. The production of dental caries in rats fed an adequate diet. *J Dent Res.* Feb 1932; 12(1): 161-73.
15. Rosebury T, Karshan M, Foley G. Studies, in the rat, of susceptibility to dental caries: III. The experimental production of typical dental fissure-caries and other lesions in rats, and preliminary studies of their etiology. *J Dent Res.* 1933; 13: 379-98.
16. Harrison RW. Bacteriological studies on experimental dental caries in the rat: I. Bacterial flora of normal, non-carious teeth. *J Infect Dis.* 1940; 67(2): 91-6.
17. Harrison RW. Bacteriological studies on experimental dental caries in the rat: II. Changes in tooth surface flora associated with development and inhibition, of dental caries. *J Infect Dis.* 1940; 67(2): 97-105.
18. Harrison RW. Bacteriological studies on experimental dental caries in the rat: III. Flora of advanced carious lesions. *J Infect Dis.* 1940; 67(2): 106-12.
19. Kite OW, Shaw JH, Sognnaes RF. The prevention of experimental tooth decay by tube-feeding. *J Nutr.* 1950 Sep; 42(1): 89-105.
20. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res.* 1954 Apr; 33(2): 147-74.
21. Karmin BB. The effects of a high carbohydrate diet on the teeth of para-biosed albino rats. *J Dent Res.* 1954 Apr; 33(2): 175-80.
22. Wynn W, Haldi J, Bentley KD, Law ML. Dental caries in the albino rat in relation to the chemical composition of the teeth and of the diet. II. Variations in the Ca/P ratio of the diet induced by changing the phosphorus content. *J Nutr.* 1956 Mar 10; 58(3): 325-33.
23. Herzog E, König KG, Schmid R. The influence of different carbohydrates, of drinking, and of toothbrushing on oral sugar clearance in Osborne-Mendel rats. *Helv Odontol Acta.* 1966 Oct; 10(2): 114-20.
24. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61: 9-19.
25. Gibbons RJ, Berman KS, Knoettner P, Kapsimalis B. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch Oral Biol.* 1966 Jun; 11(6): 549-60.
26. Gamboa F, Chaves M, Estupiñán M, Galindo A. Detección de mutacinas en biotipos de cepas *S. mutans* aisladas de niños preescolares con y sin caries dental. *Univ Odontol.* 2006 Jun-Dic; 25(57): 7-13.
27. Kuramitsu H. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 159-76.
28. Slee AM, Tanzer JM. Sucrose transport by *Streptococcus mutans*: Evidence for multiple transport systems. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Nov 22; 692(3): 415-24.
29. Tanzer JM, Thompson A, Wen ZT, Burne RA. *Streptococcus mutans*: fructose transport, xylitol resistance, and virulence. *J Dent Res.* 2006 Apr; 85(4): 369-73.
30. Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol.* 2000; 42: 239-74.
31. Gmür R, Giertsen E, van der Veen MH, de Josselin de Jong E, ten Cate JM, Guggenheim B. In vitro quantitative light-induced fluorescence to measure changes in enamel mineralization. *Clin Oral Investig.* 2006 Sep; 10(3): 187-95.
32. Thurnheer T, Giertsen E, Gmür R, Guggenheim B. Cariogenicity of soluble starch in oral in vitro biofilm and experimental rat caries studies: a comparison. *J Appl Microbiol.* 2008 Sep; 105(3): 829-36.
33. Tanzer JM, Thompson A, Sharma K, Vickerman MM, Haase EM, Scannapieco FA. *Streptococcus mutans* out-competes *Streptococcus gordonii* in vivo. *J Dent Res.* 2012 May; 91(5): 513-9.
34. Aikawa C, Furukawa N, Watanabe T, Minegishi K, Furukawa A, Eishi Y, Oshima K, Kurokawa K, Hattori M, Nakano K, Maruyama F, Nakagawa I, Ooshima T. Complete genome sequence of the serotype k *Streptococcus mutans* strain LJ23. *J Bacteriol.* 2012 May; 194(10): 2754-5.

35. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct; 99(22): 14434-9.
36. Maruyama F, Kobata M, Kurokawa K, Nishida K, Sakurai A, Nakano K, Nomura R, Kawabata S, Ooshima T, Nakai K, Hattori M, Hamada S, Nakagawa I. Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics*. 2009 Aug; 10: 358.
37. Biswas S, Biswas I. Complete genome sequence of *Streptococcus mutans* GS-5, a serotype c strain. *J Bacteriol*. 2012 Sep; 194(17): 4787-8.
38. Fukuzato Y, Matsuura T, Ozaki K, Matsuura M, Sano T, Nakahara Y, Kodama Y, Nakagawa A, Okamura S, Suido H, Torii K, Makino T, Narama I. Morphological study on dental caries induced in WBN/KobSlc rats (*Rattus norvegicus*) fed a standard laboratory diet. *Lab Anim*. 2009 Oct; 43(4): 376-81.
39. Taylor GW, Manz MC, Borgnakke WS. Diabetes, periodontal diseases, dental caries, and tooth loss: a review of the literature. *Compend Contin Educ Dent*. 2004 Mar; 25(3): 179-84, 186-8, 190.
40. Nakama K, Shichinohe K, Kobayashi K, Naito K, Uchida O, Yasuhara K, Tobe M. Spontaneous diabetes-like syndrome in WBN/Kob rats. *Acta Diabetol Lat*. 1985; 22: 335-42.
41. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Dahlen G, Rattarasarn C. Root surface and coronal caries in adults with type 2 diabetes mellitus. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007; 35: 302-9.
42. Kodama Y, Matsuura M, Sano T, Nakahara Y, Ozaki K, Narama I, Matsuura T. Diabetes enhances dental caries and apical periodontitis in caries-susceptible WBN/KobSlc rats. *Comp Med*. 2011 Feb; 61(1): 53-9.
43. Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Rybicka M, Noceń I, Dudzińska W, Marchlewicz M, Wiszniewska B, Chlubek D. Changes in the concentration of microelements in the teeth of rats in the final stage of type 1 diabetes, with an absolute lack of insulin. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Mar; 139(3): 332-40.
44. Yaras N, Sariahmetoglu M, Bilginoglu A, Aydemir-Koksoy A, Onay-Besikci A, Turan B, Schulz R. Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. *Br J Pharmacol*. 2008 Dec; 155(8): 1174-84.
45. Yaras N, Ugur M, Ozdemir S, Gurdal H, Purali N, Lacampagne A, Vassort G, Turan B. Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca²⁺ homeostasis in rat heart. *Diabetes*. 2005 Nov; 54(11): 3082-8.
46. Akpata ES, Alomari Q, Mojiminiyi OA, Al-Sanae H. Caries experience among children with type 1 diabetes in Kuwait. *Pediatr Dent*. 2012; 34(7): 468-72.
47. Abdus Salam M, Matsumoto N, Matin K, Tsuha Y, Nakao R, Hanada N, Senpuku H. Establishment of an animal model using recombinant NOD.B10.D2 mice to study initial adhesion of oral streptococci. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Mar; 11(2): 379-86.
48. Ito T, Maeda T, Senpuku H. Roles of salivary components in *Streptococcus mutans* colonization in a new animal model using NOD/SCID.e2f1-/- mice. *PLoS One*. 2012; 7(2): e32063.
49. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*. 1999 Jan; 79(Suppl 1): S3-S22.
50. Aps JK, Delanghe J, Martens LC. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Apr; 40(4): 345-50.
51. Aps JK, Van Maele GO, Claeys G, Martens LC. Mutans streptococci, lactobacilli and caries experience in cystic fibrosis homozygotes, heterozygotes and healthy controls. *Caries Res*. 2001 Nov-Dec; 35(6): 407-11.
52. Catalán MA, Scott-Anne K, Klein MI, Koo H, Bowen WH, Melvin JE. Elevated incidence of dental caries in a mouse model of cystic fibrosis. *PLoS One*. 2011 Jan 31; 6(1): e16549.
53. Webman H, Hill TJ, Kniesner AH. The effect of penicillin on dental caries in rats fed on a coarse corn diet. *J Dent Res*. 1949 Jun; 28(3): 258-62.
54. Abhyankar S, Sandham HJ, Chan KH. Serotype c *Streptococcus mutans* mutatable to lactate dehydrogenase deficiency. *J Dent Res*. 1985 Nov; 64(11): 1267-71.
55. Fitzgerald RJ, Adams BO, Sandham HJ, Abhyankar S. Cariogenicity of a lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* serotype c in gnotobiotic rats. *Infect. Immun*. 1989 Mar; 57(3): 823-6.
56. Murata RM, Branco-de-Almeida LS, Franco EM, Yatsuda R, dos Santos MH, de Alencar SM, Koo H, Rosalen PL. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. *Biofouling*. 2010 Oct; 26(7): 865-72.

57. Branco-de-Almeida LS, Murata RM, Franco EM, dos Santos MH, de Alencar SM, Koo H, Rosalen PL. Effects of 7-epiclusianone on *Streptococcus mutans* and caries development in rats. *Planta Med.* 2011 Jan; 77(1): 40-5.
58. Baptista A, Kato IT, Prates RA, Suzuki LC, Rael MP, Freitas AZ, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. *Photochem Photobiol.* 2012 May-Jun; 88(3): 584-9.
59. Yang J, Liu T, Li J. [Study on potential anti-caries DNA vaccine pcDNA3-gtfB integration into host cell genome]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2003 Jun; 21(3): 228-30.
60. Guo JH, Jia R, Fan MW, Bian Z, Chen Z, Peng B. Construction and immunogenic characterization of a fusion anti-caries DNA vaccine against PAc and glucosyltransferase I of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 2004 Mar; 83(3): 266-70.
61. Liu C, Fan M, Xu Q, Li Y. Biodistribution and expression of targeted fusion anti-caries DNA vaccine pGJA-P/VAX in mice. *J Gene Med.* 2008 Mar; 10(3): 298-305.
62. Lui GX, Xu QA, Jin J, Li YH, Jia R, Guo JH, Fan Mw. Mucosal and systemic immunization with targeted fusion anti-caries DNA plasmid in young rats. *Vaccine.* 2009 May 14; 27(22): 2940-7.
63. Featherstone JD, Stookey GK, Kaminski MA, Faller RV. Recommendation for a non-animal alternative to rat caries testing. *Am J Dent.* 2011 Oct; 24(5): 289-94.

CORRESPONDENCIA

Lorenza María Jaramillo Gómez
lorenzaj@javeriana.edu.co

Nelly Stella Roa Molina
nelly.roa@javeriana.edu.co

Margarita Chaves Clavijo
Margarita.chavez@javeriana.edu.co

Camilo Durán Correa
camilo.duran@javeriana.edu.co